

Dup

Univ. Exchange NOV 23 1928

Lane Medical Library

UNIVERSITÉ DE LAUSANNE
INSTITUT DE PHYSIOLOGIE
(Prof. Dr MAURICE ARTHUS)

ÉTUDES SUR LA STABILITÉ DES ANTIVENINS

THÈSE

PRÉSENTÉE A LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE L'UNIVERSITÉ
DE LAUSANNE PAR

M^{lle} JANET D. E. YOUNG
Méd. Fed.

POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR
EN MÉDECINE



LAUSANNE
IMPRIMERIE-LITHOGRAPHIE „SIMPLON“ S. A.

1927

ÉTUDES
SUR LA STABILITÉ DES
ANTIVENINS

UNIVERSITÉ DE LAUSANNE
INSTITUT DE PHYSIOLOGIE
(Prof. Dr MAURICE ARTHUS)

ÉTUDES SUR LA STABILITÉ DES ANTIVENINS

THÈSE

PRÉSENTÉE A LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE L'UNIVERSITÉ
DE LAUSANNE PAR

M^{lle} JANET D. E. YOUNG
Méd. Fed.

POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR
EN MÉDECINE



LAUSANNE
IMPRIMERIE-LITHOGRAPHIE „SIMPLON“ S. A.

1927

UNIVERSITÉ DE LAUSANNE

FACULTÉ DE MÉDECINE

La Faculté de Médecine de l'Université de Lausanne, sans se prononcer sur les opinions du candidat et ensuite des rapports favorables de MM. les professeurs Arthus et Larguier, autorise l'impression de la thèse intitulée :

Etudes sur la stabilité des antivenins

présentées par Mlle Janet D. E. Young, pour l'obtention du grade de DOCTEUR EN MÉDECINE.

Lausanne, le 7 août 1927.

Le Doyen :

Prof. J. GONIN.

*A mon cher et très honoré maître M. le professeur
ARTHUS avec mes hommages de vive reconnaissance pour
toute la bienveillance qu'il m'a témoignée au cours de mon
travail de doctorat et pendant toutes mes études médicales.*

ÉTUDES SUR LA STABILITÉ DES ANTIVENINS

Les sérums antitoxiques et, par exemple, les sérums antidiphthérique et antitétanique conservent leurs propriétés spécifiques pendant très longtemps ; ils ne sont pourtant pas d'une stabilité absolue, et il est telle circonstance qui diminue singulièrement leur puissance. Aussi est-il recommandé de ne pas employer pour le traitement des malades des sérums antitoxiques trop vieux, par exemple des sérums datant de plusieurs années, surtout s'ils n'ont pas été gardés dans les conditions les plus favorables à la conservation de leurs propriétés.

« Dans des flacons bien remplis, conservés à l'obscurité, écrit M. Macé dans son *Traité de Bactériologie*, 5^e édition, p. 379, le sérum garde longtemps sa puissance antitoxique.

De nombreuses expériences démontrent qu'il peut rester un an et plus sans s'affaiblir, ou en ne s'affaiblissant que d'une manière insignifiante... La lumière du jour a une action affaiblissante manifeste, quoique lente ; après trois ou quatre mois, le pouvoir antitoxique est très diminué ; ce sont surtout les rayons bleus qui agissent, les rayons jaunes et rouges sont très peu actifs. »

Les venins de serpents possèdent maintes analogies avec les toxines, et les sérums antivenimeux maintes analogies avec les sérums antidiphthérique et antitétanique. Or, il est assurément beaucoup plus facile de fixer rigoureusement la puissance antitoxique de certains sérums antivenimeux qu'il n'est possible de le faire pour les sérums neutralisant les toxines microbiennes. Il a donc semblé intéressant de rechercher si les sérums antivenimeux et le sérum anticobraïque en particulier s'atténuent en vieillissant.

M. le professeur Maurice Arthus a mis à notre disposition, pour nous permettre de résoudre ce problème, des échantillons de sérum antivenimeux de l'Institut Pasteur et de sérum antivenimeux de l'Institut brésilien de Sao Paolo, qu'il possédait depuis une quinzaine d'années. Nous avons également pu utiliser des échantillons de venins ayant conservé invariablement leurs propriétés toxiques pendant le même temps. En comparant nos résultats avec ceux qui ont été obtenus jadis au laboratoire de physiologie avec les mêmes substances et qui ont été publiés dans des thèses de doctorat, il nous a été facile de tirer des conclusions.

Les recherches expérimentales faites au laboratoire de physiologie de Lausanne en 1910-1912 ont mis en œuvre un échantillon de venin de cobra indochinois.

En se reportant aux graphiques conservés au laboratoire, on peut fixer très exactement sa puissance toxique.

Voici le résumé des résultats obtenus dans 12 essais où l'on a injecté dans les veines de lapins de 2 kg. environ une même quantité de venin, à savoir 2 milligrammes de résidu sec. — Nous notons ici trois moments de l'intoxication cobraïque : 1^o le début des accidents cardiaques traduisant l'installation de l'asphyxie ; 2^o la fin des convulsions asphyxiques qui coïncide à très peu près avec l'arrêt respiratoire ; 3^o la chute de la pression artérielle à zéro.

Nos	Poids du lapin	Accidents cardiaques	Arrêt respiratoire	Chute de la pression artérielle à zéro
	GRAMMES	MINUTES	MINUTES	MINUTES
1	2200	13	20	24
2	2310	14	20	24
3	1810	10	17	22
4	1770	10	18	21
5	2020	14	19	23
6	2480	15	21	25
7	2050	12	18	22
8	1990	12	19	23
9	2030	15	20	25
10	1950	14	18	21
11	2120	13	17	21
12	1910	12	18	23
Moyennes	2050	13	19	22

Avec ce même échantillon, nous avons fait 4 cobraïsa-
tions sur des lapins. Voici nos résultats :

Lapin a. 2260 grammes.

Injection intraveineuse de 2 milligrammes de résidu sec
du venin de cobra indochinois dissous dans 2 centimètres
cubes d'eau salée à 1 pour 100.

Début des accidents cardiaques	14 minutes.
Arrêt respiratoire	21 »
Chute à zéro de la pression artérielle	25 »

Lapin b. 1980 grammes.

Même injection intraveineuse que le lapin *a*.

Début des accidents cardiaques	12 minutes.
Arrêt respiratoire	18 »
Chute à zéro de la pression artérielle	21 »

Lapin c. 2190 grammes.

Même injection que les deux autres lapins *a* et *b*.

Début des accidents cardiaques	13 minutes.
Arrêt respiratoire	19 »
Chute à zéro de la pression artérielle	23 »

Lapin d. 1940 grammes.

Même injection que les trois lapins *a*, *b*, *c*.

Début des accidents cardiaques	13 minutes.
Arrêt respiratoire	18 »
Chute à zéro de la pression artérielle	22 »

Soit sous la forme de ce tableau :

Nos	Poids du lapin	Accidents cardiaques	Arrêt respiratoire	Chute de la pression artérielle à zéro
	GRAMMES	MINUTES	MINUTES	MINUTES
<i>a</i>	2260	14	21	25
<i>b</i>	1980	12	18	21
<i>c</i>	2190	13	19	23
<i>d</i>	1940	13	18	22
Moyennes	2090	13	19	23

De ces chiffres comparés à ceux du tableau précédent, nous pouvons conclure que le venin de cobra a intégralement conservé son acuité paralysante pendant la période de 15 ans qui s'étend de 1912 à 1927.

Nous avons relevé dans les thèses de Mlle R. Kogan (De la durée de l'immunisation passive engendrée par le sérum antivenimeux, 1911, Lausanne) et de Mlle Frichtenberg (Recherches sur les sérums antivenimeux. Action de l'état d'anaphylaxie sérique sur l'activité préventive et curative du sérum antivenimeux, 1911, Lausanne), ainsi que dans l'ouvrage du prof. Maurice Arthus « De l'anaphylaxie à l'immunité », les chiffres réunis dans le tableau suivant.

Nous n'avons retenu ici que les expériences dans lesquelles 2 centimètres cubes de sérum antivenimeux, puis 3 milligrammes de résidu sec de venin, avaient été injectés soit immédiatement après le sérum, soit dans un intervalle ne dépassant pas 5 heures.

Des 3 milligrammes de venin, une partie est détruite par le sérum préalablement injecté ; les accidents sont la conséquence de l'action du venin en excès, que le sérum n'a pas neutralisé.

Nos	Poids du lapin	Intervalle entre l'injec- tion du sérum et du venin	Accidents cardiaques	Arrêt respiratoire	Chute à zéro de la pression artérielle
	GRAMMES		MINUTES	MINUTES	MINUTES
1	1890	Aussitôt	17	25	30
2	2000	id.	20	26	30
3	1990	15 min.	19	27	32
4	2420	1 heure	24	35	40
5	1760	1 $\frac{1}{4}$ »	21	31	33
6	2280	4 heures	22	31	35
7	2250	4 $\frac{1}{2}$ »	19	27	32
8	2400	5 »	26	34	38
9	1950	5 »	20	42	46
10	1980	5 $\frac{1}{2}$ »	20	30	35
Moyennes	2080	—	21	31	35

Les essais suivants ont été faits avec le même échantillon de venin de cobra dont avaient usé les expérimentateurs de 1911, et avec des échantillons de sérum antivenimeux de la même préparation que ceux qui avaient fourni les résultats précédents ; ces échantillons avaient seulement vieilli de 16 ans depuis lors. C'étaient deux flacons de 10 centimètres cubes de sérum antivenimeux qui avaient été maintenus pendant cette longue période dans leur gaine de bois, bien fermée, ne laissant pas pénétrer la lumière.

Lapin A. 2350 grammes.

Injection intraveineuse de 2 centimètres cubes de sérum antivenimeux vieilli ; puis, tout aussitôt après, injection de 3 milligrammes de venin de cobra en solution à 1 pour 1000 dans l'eau salée à 2 pour 100.

Début des accidents cardiaques	10 minutes.
Arrêt respiratoire	17 ,
Chute à zéro de la pression artérielle	20 ,

Lapin B. 1960 grammes.

Mêmes injections que pour le lapin A ; mais le venin a été injecté 15 minutes après le sérum antivenimeux.

Début des accidents cardiaques	9 minutes.
Arrêt respiratoire	16 ,
Chute à zéro de la pression artérielle	20 ,

Lapin C. 2020 grammes.

Mêmes injections qu'aux lapins A et B. L'injection du venin a été faite 30 minutes après celle du sérum antivenimeux.

Début des accidents cardiaques	12 minutes.
Arrêt respiratoire	19 ,
Chute à zéro de la pression artérielle	22 ,

Lapin D. 1890 grammes.

Le sérum est injecté 1 heure avant le venin ; les quantités de sérum antivenimeux et de venin sont les mêmes que ci-dessus.

Début des accidents cardiaques	11 minutes.
Arrêt respiratoire	18 ,
Chute à zéro de la pression artérielle	21 ,

Voici ces résultats sous forme de tableau :

Nos	Poids du lapin	Intervalle entre l'injection du sérum et du venin	Accidents cardiaques	Arrêt respiratoire	Chute à zéro de la pression artérielle
	GRAMMES		MINUTES	MINUTES	MINUTES
A	2350	Aussitôt	10	17	21
B	1960	15 min.	9	16	20
C	2020	30 »	12	19	22
D	1890	1 heure	11	18	21
Moyennes	2055	—	10 ½	18	21

Ces résultats sont de très facile interprétation : le sérum antivenimeux, vieux de plus de 16 ans, a une action antitoxique indéniable, puisque grâce à lui, le lapin recevant 3 milligrammes de venin de cobra ne meurt pas plus vite que le lapin non traité par le sérum recevant 2 milligrammes.

Voici d'ailleurs, à titre de renseignements, des nombres que nous relevons soit dans l'ouvrage « De l'anaphylaxie à l'immunité », du prof. Maurice Arthus, soit dans la thèse de Mlle Boleslawa Stawska (Etudes sur le venin de cobra. Lausanne 1910). Les lapins neufs ont reçu 3 milligrammes de venin de cobra en injection intraveineuse, sans sérum antivenimeux.

Poids du lapin	Accidents cardiaques	Arrêt respiratoire	Chute de la pression artérielle à zéro
GRAMMES	MINUTES	MINUTES	MINUTES
2140	8	12	16
1840	7	12	16
1700	7	13	15
Moyennes	7 ⅓	12 ⅓	15 ⅔

Donc le sérum antivenimeux vieux de 16 ans possède encore un pouvoir antitoxique très net.

Nous pouvons constater, d'autre part, en nous reportant aux nombres de nos divers tableaux que les accidents et la mort se produisent à peu près aux mêmes moments, qu'il s'agisse de lapins recevant 2 milligrammes de venin sans sérum, ou de lapins recevant 2 centimètres cubes de sérum et 3 milligrammes de venin. D'où nous pouvons conclure que 2 centimètres cubes de sérum antivenimeux vieux de plus de 16 ans neutralisent 1 milligramme de venin ; dès lors 1 centimètre cube de sérum antivenimeux vieux neutralise 0,5 milligramme de venin.

Les lapins qui, en 1911-1912, avaient subi la double injection, 2 centimètres cubes de sérum antivenimeux et 3 milligrammes de venin, présentaient leurs accidents comme suit (moyenne d'un tableau précédent) :

Début des accidents cardiaques	21 minutes.
Arrêt respiratoire	31 »
Chute à zéro de la pression artérielle	35 »

Ces résultats sont sensiblement les mêmes que ceux qu'on observe quand, chez le lapin neuf, on injecte dans les veines 1 ½ à 1 ¾ milligramme de venin sans sérum.

Voici trois expériences, relevées d'après les documents du laboratoire de physiologie :

	Poids du lapin	Quantité de venin injecté	Accidents cardiaques	Arrêt respiratoire	Chute à zéro de la pression artérielle
	GRAMMES	MILLIGR.	MINUTES	MINUTES	MINUTES
	2000	1,50	27	45	48
	2350	1,75	25	36	39
	2220	1,50	25	40	44
Moyennes	2190	1,60	26	40	44

Si on admet que les nombres les plus voisins sont ceux correspondant à l'injection de 1,75 milligrammes de venin, on en conclura qu'à l'origine le sérum antivenimeux neutralisait, pour 2 centimètres cubes, 1,25 milligrammes de venin, soit pour 1 centimètre cube 0,62 ou environ 0,60. Quand il a vieilli de 16 ans, il a neutralisé environ 0,50. Il a donc perdu 10 pour 60 de sa valeur ou environ 15 à 16 p. cent.

Ces résultats démontrent donc sinon la stabilité absolue du sérum antivenimeux, au moins sa très grande résistance à la destruction, quand il est conservé dans les conditions précisées ci-dessus : flacon hermétiquement clos, maintenu dans une gaine de bois, à la température du laboratoire.

Le venin de cobra ne possède pas seulement la propriété de tuer les animaux par paralysie périphérique de type curare ; le prof. Maurice Arthus a établi qu'il possède encore des propriétés protéotoxiques et une action anticoagulante qui s'exerce sur le sang *in vivo* et *in vitro* ; le sérum antivenimeux, d'ailleurs, neutralise toutes ces propriétés toxiques et non pas seulement la première. Les propriétés protéotoxiques, en raison des variations considérables de la sensibilité des divers individus, ne se prêtent pas à l'analyse que nous poursuivons. Mais la propriété anticoagulante va nous permettre de rechercher la stabilité du sérum antivenimeux.

Le venin de cobra retarde la coagulation du plasma citraté de sang de cheval quand on ajoute à celui-ci du chlorure de calcium, comme si le venin de cobra retardait la transformation de la prothrombine en thrombine.

Voici un exemple emprunté à l'ouvrage du prof. Maurice Arthus déjà cité (p. 295).

Plasma citraté	Eau salée à 1 %	Venin de cobra à 1 p. 1000	Chlorure de calcium à 2 p. 100	Durée de la coagulation
CC.	GOUTTES	GOUTTES	CC.	MIN. SEC.
5	5	0	1	17 30
5	4	1	1	26 45
5	3	2	1	35 30
5	2	3	1	43 15
5	1	4	1	51 00
5	0	5	1	63 00

Or, continue le prof. Maurice Arthus, quand on ajoute au venin de cobra in vitro du sérum anticobraïque, on diminue (pour les faibles doses de sérum) ou l'on supprime (pour des doses suffisantes de sérum) l'action anticoagulante du venin de cobra, ainsi qu'en témoignent les résultats suivants :

Plasma citraté	Eau salée à 1 %	Venin de cobra à 1 p. 1000	Sérum anticobraïque dilué à ¼	Chlorure de calcium à 2 p. 100	Durée de la coagulation
CC.	GOUTTES	GOUTTES	GOUTTES	CC.	MIN. SEC.
5	6	1	0	1	26 45
5	5	1	1	1	23 15
5	4	1	2	1	19 00
5	3	1	3	1	17 45
5	2	1	4	1	17 30
5	0	1	6	1	17 03

La neutralisation a donc été parfaite dans les mélanges contenant au moins 4 gouttes de sérum dilué à $\frac{1}{4}$; la coagulation s'y est faite en 17 min. 30 sec. comme elle se faisait (tableau précédent) dans le mélange ne contenant pas de venin. Pour des proportions moindres de sérum, la coagulation s'est faite d'autant plus tardive que cette proportion était plus faible. En l'absence de sérum, la coagulation s'est faite en 26 min. 45 sec., comme elle s'était faite ci-devant (tableau précédent) pour le mélange contenant 1 goutte de venin.

Si l'on veut bien remarquer que le mélange contenant 3 gouttes de sérum antivenimeux dilué à $\frac{1}{4}$ neutralise presque exactement le venin contenu dans 1 goutte de la solution à 1 p. 1000, puisque la coagulation s'y fait en 17 min. 45 sec. au lieu de 17 min. 30 sec., il est facile de calculer la puissance neutralisante du sérum pour la substance anticoagulante. Sont équivalents 1 goutte de venin et 3 gouttes de sérum à $\frac{1}{4}$ ou $\frac{3}{4}$ goutte de sérum non dilué. Donc 1 milligramme de venin voit sa propriété anticoagulante neutralisée par $\frac{3}{4}$ cc. de sérum antivenimeux ; ou si l'on veut 1 cc. de sérum antivenimeux neutralise 1,33 cc. de venin à 1 pour 1000, soit 1,33 milligramme.

Or nous avons indiqué ci-devant que ce même sérum ne neutralise que 0,62 mgr. de venin quand on considère son action paralysante.

Les expériences que nous venons de transcrire ont été faites en 1910-1911, à l'aide du venin indochinois dont il a déjà été question et avec le sérum antivenimeux dont deux flacons ont été conservés au laboratoire jusqu'en 1927.

Il nous a été possible de renouveler ces essais en cette année 1927, le sérum employé étant ainsi vieux d'au moins 16 ans.

Les essais ont été faits avec deux échantillons différents de plasma citraté de cheval. Nos résultats sont présentés dans les deux tableaux suivants :

1^{er} Essai

Plasma citraté	Eau salée à 1 %	Venin de cobra à 1 p. 1000	Sérum anticobraïque dilué au $\frac{1}{4}$	Chlorure de calcium à 2 p. 100	Durée de la coagulation
CC.	GOUTTES	GOUTTES	GOUTTES	CC.	MIN. SEC.
5	9	0	0	1	8 30
5	6	1	2	1	18 00
5	5	1	3	1	15 30
5	4	1	4	1	9 00
5	3	1	5	1	8 30
5	2	1	6	1	8 30
5	0	1	8	1	8 30

2^{me} Essai

Plasma citraté	Eau salée à 1 %	Venin de cobra à 1 p. 1000	Sérum anticobraïque non dilué	Chlorure de calcium à 2 p. 100	Durée de la coagulation
CC.	GOUTTES	GOUTTES	GOUTTES	CC.	MIN. SEC.
10	12	0	0	2	12 00
10	7	4	1	2	20 30
10	6	4	2	2	17 00
10	5	4	3	2	15 30
10	4	4	4	2	12 40
10	3	4	5	2	12 00
10	2	4	6	2	12 00
10	0	4	8	2	12 00

Les résultats des deux tableaux sont rigoureusement concordants. La neutralisation est totale dans tous les mélanges contenant au moins 5 gouttes de la liqueur sérique. Elle est à peu près totale là où il y a 4 gouttes.

Si nous procédons comme ci-devant, nous dirons que 4 gouttes de sérum non dilué neutralisent 4 gouttes de venin à 1 pour 1000, ou que 4 gouttes de sérum dilué à $\frac{1}{4}$ neutralisent 1 goutte de venin à 1 pour 1000. Donc 1 centimètre cube de sérum antivenimeux vieilli neutralise 1 milligramme de venin.

A l'origine, il en neutralisait 1,33, la diminution est de 33 pour 133 ou de $\frac{1}{4}$ ou de 25 pour cent, donc un peu plus forte que pour la substance neutralisant l'élément paralysant.

Il ne nous a pas été possible de faire des vérifications aussi exactes avec deux échantillons de sérums brésiliens conservés au laboratoire depuis 13 ou 14 ans ; parce qu'en 1913 ou 1914, date à laquelle des essais en avaient été faits, on n'avait pas fixé exactement la puissance neutralisante de ces sérums dont l'un était du sérum antibothropique (actif vis-à-vis du venin de *Lachesis lanceolatus*) et l'autre du sérum anticrotalique (actif vis-à-vis du venin de *Crotalus terrificus*).

La seule indication que nous possédions, c'est qu'autrefois ces sérums à la dose de 1 centimètre cube neutralisaient au moins 1 milligramme du venin correspondant.

Voici, en effet, une expérience que le prof. Maurice Arthus a notée dans son ouvrage « De l'anaphylaxie à l'immunité », p. 302.

Je prépare les liqueurs suivantes :

1. — 2 cc. sang de peptone
2. — 2 cc. id. + 4 gouttes sérum antithropique.
3. — 2 cc. id.
4. — 2 cc. id. + 4 gouttes sérum anticrotalique.

Le sang de peptone dont il est ici question est du sang de chien rendu incoagulable par injection intraveineuse d'une quantité convenable de peptone de Wette.

J'ajoute aux liqueurs 1 et 2 : 4 gouttes de venin de *Lachesis lanceolatus* à 1 pour 1000, et aux liqueurs 3 et 4 : 4 gouttes de venin de *Crotalus terrificus* à 1 pour 1000.

Je note la coagulation massive de 1 en 20 secondes et celle de 3 en 25 secondes. Les liqueurs 2 et 4 ne coagulent pas, même en 24 heures.

D'autres essais ont jadis été faits à l'aide de liqueurs fibrinogénées diverses, plasmas fluorés, oxalatés, citratés de sang de cheval, solutions chlorurées sodiques de fibrinogène : mêmes résultats ont été obtenus.

Nous avons repris ces essais en faisant agir les deux mêmes venins (mêmes échantillons) sur du plasma de sang de cheval citraté à 5 pour 1000. Nous avons reconnu que 4 gouttes de l'un et de l'autre de ces sérums ne neutralisent plus complètement 4 gouttes de la solution du venin correspondant à 1 pour 1000 : en effet, le mélange à volumes

égaux de venin de *Lachesis lanceolatus* à 1 pour 1000 et de sérum antiothérique vieilli, ou le mélange à volumes égaux de venin de *Crotalus terrificus* à 1 pour 1000 et de sérum anticrotalique font coaguler le plasma citaté. Pour supprimer cette action coagulante des venins, il nous a fallu ajouter 5 gouttes des sérums antivenimeux à 4 gouttes du venin en solution à 1 pour 1000.

Ceci montre une atténuation du pouvoir neutralisant des sérums ; mais nous ne saurions représenter par un nombre la grandeur de cette atténuation.

RÉSUMÉ

Le sérum anticobraïque conservé en flacons fermés à la température du laboratoire et à l'obscurité se montre assez stable dans son pouvoir antitoxique : au bout de 16 ans son atténuation s'est révélée peu considérable, mais pourtant nettement constatable, tant au point de vue de son action neutralisante de la substance paralysante du venin qu'au point de vue de son action neutralisante de la substance anticoagulante.

Les sérums antithrombotique et anticrotalique possèdent encore, après 13 ou 14 ans de conservation dans les mêmes conditions que le sérum anticobraïque, une activité antithrombine puissante, moindre pourtant que celle qu'ils avaient antérieurement manifestée.
